

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁷ A61K 31/70		(11) 공개번호	특2001-0089904
		(43) 공개일자	2001년 10월 13일
(21) 출원번호	10-2001-7005184		
(22) 출원일자	2001년 04월 25일		
번역문제출일자	2001년 04월 25일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/24758	(87) 국제공개번호	WO 2000/24885
(86) 국제출원출원일자	1999년 10월 22일	(87) 국제공개일자	2000년 05월 04일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴		
(30) 우선권주장	60/105,695	1998년 10월 26일	미국(US)
(71) 출원인	에이브이아이 바이오파마 인코포레이티드		
	미국 오리건주 97258 포틀랜드 사우스웨스트 콜롬비아 원 스위트 1105		
(72) 발명자	이버슨파트릭엘.		
	미국오리건주97330코발리스노스웨스트페어옥스플레이스5902		
(74) 대리인	박종혁, 이기석, 김정욱, 안상정, 정상영		

심사청구 : 없음

(54) p 53 모르폴리노-기초 안티센스

명세서

기술분야

본 발명은 p 53 의 유발을 특징으로 하는 질병 상태의 치료를 위한 안티센스 억제제 및 방법에 관한 것이다. 이러한 상태는 암, 레스테노시스, 및 건선과 같은 증식성 세포 장애, 및 뇌졸중과 같은 국소빈혈 공격에 의해 유발된 저산소증 상태를포함한다.

참고문헌

- Adhad, N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:294-301 (1998).
- Agrawal, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(4):1401-5 (1990).
- Arora, V., Ph.D. Dissertation, Dep. Pharmacol., Univ. Nebraska Coll. Med. (1998).
- Assy, N. et al., "Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats," *J Lab Clin Med* **131**(3):251-256 (1998).
- Bonham, M.A. et al., *Nucleic Acids Res.* **23**(7):1197-1203 (1995).
- Boudvillain, M. et al., *Biochemistry* **36**(10):2925-31 (1997).
- Chen, J.-K. et al., *Nucleic Acids Res.* **23**:2661-8 (1994).
- Cross, S.M. et al., *Science* **267** (5202) p1353-6 (1995).
- Edelman, E.R. et al., *Circ. Res.* **76**(2):176-182 (1995).
- Farrell, C.L. et al., *Antisense Res. and Dev.* **5**:175-183 (1995).
- Gambacorti-Passerini, C. et al., *Blood* **88**(4):1411-7 (1996).
- Gee, J.E. et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* **8**:103-111 (1998).
- Giles, R.V. et al., *Anticancer Drug Des.* **8**(1):33-51 (1993).
- Graeber, T.G. et al., *Mol. Cell Biol.* **14**(9):6264-77 (1994).
- Grisham, J.W. et al., "Cell cycle and chemical carcinogenesis," *Surv. Synth. Pathol. Res.* 9-66 (1983).
- Gryaznov, S.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:5798-5802 (1995).
- Hanvey, J.C. et al., *Science* **258**:1481-85 (1992).
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. "Cell cycle control and cancer," *Science* **266**:1821-28 (1994).
- Higgins, G.M. and Anderson, R.M. *Arch. Pathol.* **12**:186. (1931).
- Horiguchi et al., *Takeda Kenyushoho* **55**:149-159 (1996).
- Johansson, H.E. et al., *Nucleic Acids Res.* **22**:4591-8 (1994).

- Kanoh *et al.*, *Bioorg. Chem. Lett.* **7**:2847 (1997).
- Kastan, M.B. *et al.*, *Cell* **71**: 587-97. (1992).
- Khooustov, V.I., *et al.*, *Lab. Invest.* **73**:118-127 (1995).
- Knudsen, H. and Nielsen, P.E., *Nucleic Acids Res.* **24**(3):494-500 (1996).
- Koch *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**:531-536 (1996).
- Levine, A.J. "p53, The cellular gatekeeper for growth and division," *Cell* **88**:323-331 (1997).
- Li, Y. *et al.*, *Brain Res* **765** (2) p301-12 (1997).
- Lu, X. and Lane, D.P., *Cell* **75**(4):765-78 (1993).
- Magnelli, L. *et al.*, *Biochem Mol Med* **62**(1):3-10 (1997).
- Messmer, U.K. *et al.*, "p53 Expression in nitric oxide-induced apoptosis", *FEBS Lett* **535**(1):23-6 (1994).
- Nelson, W.G. and Kastan, M.B., *Mol. Cell Biol.* **14**: 1815-1823 (1994).
- Nielsen, P.E. *et al.*, *Science* **254**:1497-1503 (1991).
- Raafat, A.M. *et al.*, *Shock Sep* **8** (3) p186-92 (1997).
- Rininger, J.A. *et al.* "Time course comparison of cell-cycle protein expression following partial hepatectomy and WY14,643-induced hepatic cell proliferation in F344 rats." *Carcinogenesis* **18**(5):935-41 (1997).
- Rosenberg, R.D. *et al.*, U.S. Patent No. 5,593,974 (1997).
- Russell, K.J. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **36**(1099-1106 (1996).
- Russo, A. *et al.*, *Cancer Treatment Reports*, **69**(11):1293-96 (1985).
- Sato, F. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**:578-584 (1994).
- Sedlacek *et al.*, *Int. J. Oncol.* **9**:1143-1168 (1996).
- Shu, M. *et al.*, *Apoptosis* **2**:263-470 (1997).
- Soini, T. *et al.*, *Br. J. Dermatol.* **131**(4):514-20 (1994).
- Speir, E. *et al.*, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99**:78-81 (1995).
- Swe, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**:594-598 (1997).
- Tadini, G. *et al.*, *Acta Derm. Venereol. Suppl.* **146**:33-35 (1989).
- Van Dolah, F.M. *et al.*, *J. Cell Physiol.* **166**:49-56 (1996).
- Wagner, R.W. *et al.*, *Science* **260**:1510-13 (1993).
- Waldman, T. *et al.*, "Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21," *Nature* **381**:713-716 (1996).
- Xiang, H. *et al.*, *J Neurosci* **16** (21) p6753-65 (1996).
- Zhang, M. and Raveche, E.S., *Oncol Rep* **5** (1) p23-30 (1998).
- Zhu, W.Y. *et al.*, *Exp. Cell Res.* **2**:463-470 (1997).

배경기술

세포 증식에 있어서 p53의 중요성은 모든 인간 암의 반이상이 p53 돌연변이를 나타낸다는 관찰로부터 분명하다(Levine, 1997). p53 발현의 유발은 DNA 알킬화제, 산화질소(Messmer, 1994), 이온화 및 자외선 조사(Lu 및 Lane, 1993), 염색체 손상을 유발하는 제한 효소 PvuII(Lu 및 Lane, 1993), 및 DNA 스트랜드 깨짐을 유발할 수 있는 다른 약제(Nelson and Kastan, 1994)에 노출된 세포에서 관찰된다. 국소빈혈/재살포상해(Raafat, 1997), 간질의 모델(Xiang, 1996), 및 저산소증(Graeber, 1994)이 또한 p53을 유발하는 것으로 증명되었다. 본 명세서 및 이전의 연구(Rininger, 1997)에서 밝혀진대로, p53 단백질 수준도 또한 부분적인 간절제술후의 간 재생 과정동안 매우 상향조절되어, 내인성 원인의 손상 역시 생체내에서 p53의 유발을 야기할 수 있다는 것을 보여준다.

p53에 대한 역할이 세포 주기 체크포인트 활성화, 아포토시스, 분화 및 DNA 수복에서 요구되어왔다(Magnelli, 1997). 세포 주기 체크포인트는 두 가지 중요한 기능을 한다. 하나는, 세포주기에서 필수적인 사건들이 후속 사건 전에 완결되도록하는 것을 보장하는 것이다; 다른 하나는 DNA 복제 및 유사분열이 일어나기 전에 손상된 DNA의 수복을 위한 더 많은 시간을 제공하는 것이다. (Hartwell, 1994). p53의 체크포인트 활성화는 세포 주기의 S-기(DNA 합성)로 진입하는 세포 수준에서 우세하게 나타난다(Kastan, 1992). p53에 대한 G₂-M 체크포인트 활성화도 또한 p21^{ras1-1}의 업스트림 조절자로서의 p53 역할로 인해 보고되었다. 어느 단백질도 없을 때, DNA-손상된 세포는 G₂-유사 상태에서 정지하나, 그때 정상적인 유사분열(M기)을 방해하지 않고 추가적인 S기로 진행하여 예를 들어 다배수와 같은 핵 이상을 유도하여 아포토시스를 가져온다. (Waldman, 1996)

발명의 개요

한 측면에서, 본 발명은 대상 포유 동물에서 p53 유발을 특징으로하는 질병 상태를 치료하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 방법은 적당한 제약학적 당체중의 5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3'로 확인되는 염기 서열 SEQ ID NO:1, 또는 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3'로 확인되는 염기서열 SEQ ID NO:2를 가지는 안티센스 약제의 제약학적 유효량을 대상에 투여하는 것을 포함하며, 여기에서 안티센스 약제는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, N3'→P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드, 또는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드

드이다. 바람직한 구체예에서, 안티센스 약제는 바람직하게는 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 가지는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이다. 다른 바람직한 구체예에서, 안티센스 약제는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드이다.

본 발명은 또한 이러한 질병 상태 치료에 사용하기 위한 조성물을 포함한다. 이러한 조성물은 적당한 제약학적 담체내에 상기에 기술된 안티센스 약제를 포함한다.

본 발명의 방법의 바람직한 이용에서, 대상은 인간 대상이다. 질병 상태는 국소빈혈 또는 뇌졸중 또는 기관 이식 휴유증과 같은 국소빈혈/재살포 상해로부터 야기된 것일 수 있다. 대안적으로, 질병 상태는 암일 수 있고, 이 경우에 바람직한 구체예는, 세포 수준에서 라디칼 산소 종을 증가시키기에 효과적인 약제의 투여를 더 포함한다. 이러한 약제는 방사선 증강제, 이온화 방사선, 고압 산소 환경, 및 세포 수준에서 라디칼 산소 종을 증가시키는 안트라사이클린 또는 안트라퀴논과 같은 화학요법제를 포함한다.

암 치료를 위해서, 또한 방법은 세포 주기의 G₂ 기로부터 M 기로의 진행 방해에 효과적인 약제의 투여를 포함한다. 이러한 약제는 포스포키나제 C (PKC) 억제제, 비스(클로로에틸)니트로소우레아(BCNU), 펜톡시필린, 실리마린, 스타우로스포린, 페닐아히스틴, 파클리탁셀, 레티노산, 플라보피리돌, 메틸-2,5-디히드로신나메이트, 헤르복시디엔, 9-니트로캄프로테신, 마이토크신, 아피게닌, 노코다졸, 및 콜세미드를 포함한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:1, 및 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:2 로 구성되는 군으로부터 선택된 염기 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 제공하고, 여기에서 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 포함하는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드이다. 본 발명은 또한 5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:1, 및 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:2 로 구성되는 군으로부터 선택된 염기 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 제공하고 여기에서 올리고뉴클레오타이드는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드이다.

본 발명의 목적들과 특징은 하기의 발명의 상세한 설명을 첨부한 도면과 결부하여 읽을 때 더욱 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 포스포로디아미데이트-결합된 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드 유사체의 구조를 보여주고; 그리고

도 2 는 부분적인 간질제술 및 각각 SEQ ID NOs 1 및 2 를 가진 안티센스 올리고뉴클레오타이드 즉, 포스포로티오에이트(S-ODN, 1mg/200g); C-5-P 변형된 포스포로티오에이트 (C-5-P, 0.1 mg/200g); 및 중성 골격(포스포로디아미데이트) 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드(3.4 mg/200g)의 투여 후 24 시간된 래트에서 잔유 재생 간의 습윤 중량(in gm)을 보여준다. 여러 바는 각 개개의 군을 식염수-처리한 대조군에 대한 p < 0.05 의 통계학적인 차이를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

정의

'안티센스 올리고뉴클레오타이드' 또는 '안티센스 약제' 는 골격에 의해 지지되는 퓨린 및 피리미딘 헤테로고리 염기 서열을 포함하며, 표적 핵산 서열내의 상응하는, 연속적인 염기와의 수소-결합에 효과적인 분자를 언급한다. 골격은 이러한 수소 결합을 허용하는 위치에서 퓨린 및 피리미딘 헤테로고리 염기를 지지하는 서브유닛 골격 부분을 포함한다. 이러한 골격 부분은 1 내지 3 원자 길이의 인 함유 결합으로 서로 연결된, 길이가 5 내지 7 원자인 고리 부분이다.

'모르폴리노' 올리고뉴클레오타이드는 (i) 구조는 하나의 서브유닛의 모르폴리노 질소가 인접 서브유닛의 5' 환의 탄소와 연결된 1 내지 3 원자 길이의 인-황유 결합으로 서로 연결되고, (ii) B 는 폴리뉴클레오타이드의 염기와 염기-특이적 수소 결합으로 결합하기에 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기쌍 부분인 도 1 에서 보여진 형태의 모르폴리노 서브유닛 구조로 구성된다. 도 1 은 포스포로디아미데이트 결합에 의해 연결된 이러한 두개의 서브유닛을 도해한다.

'N3'→ P5' 포스포르아미데이트' 올리고뉴클레오타이드는 2'-데옥시리보스의 3'-산소가 예를 들어, Gryaznov *et al.* 및 Chen *et al.* 에 기술된대로 3'-아민에 의해 치환된 것이다.

'2'-O -알릴(또는 알킬)변형된 올리고뉴클레오타이드'는 2' 히드록실이 알릴 또는 알킬 에테르로 전환된 올리고뉴클레오타이드이다. 알킬 에테르는 전형적으로 메틸 에테르이다.

'C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드'는 티미딘 염기의 C-5 메틸기 및/또는 시티딘 염기의 C-5 수소가 프로핀기에 의해 치환된 올리고뉴클레오타이드이다.

'펩티드 핵산'에서, 올리고뉴클레오타이드 골격의 데옥시리보스 인산염 단위는 폴리아미드 결합으로 치환된다. 예를 들어, Nielsen *et al.* 및 Hanvey *et al.* 에 기술된 대로, 적당한 공간을 차지하는 골격은 메틸렌카르보닐기에 의해 각 2-아미노기에 부착한 뉴클레오타이드 염기를 가진 2-아미노에틸 글리신 단위의 사용에 의해 얻어진다.

'RNase-불활성' 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 유사체는 포스포로티오에이트와 같은 RNase-활성 올리고뉴클레오타이드와 달리, RNase-독립적 기작에 의해 작용하는 것이다. 그들은 표적 RNA 형성, 핵세포질 수송 또는 번역을 입체적으로 차단하여 기능하는 것으로 믿어지고, 따라서 또한 '입체

차단제'로 언급된다. 이 종류에는 예를 들어, 메틸포스포네이트, 여기에 언급된 대로 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산(PNA's), 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트를 포함한다.

'p53의 유발을 특징으로 하는' 상태는 감염된 세포에서 p53의 수준 또는 발현이 비-질병 상태에 비하여 상대적으로 증가하는 질병상태이고/또는 때때로 다른 치료와 결합된 p53 발현의 억제가 유리한 치료적 효과를 가지는 상태이다. 예는 암, 뇌졸중의 결과인 국소빈혈, 심근경색증, 또는 간질성 경련, 및 결과적인 저산소증상태, 및 기관 이식에서 발생가능성이 있는 국소빈혈/재살포 상태이다.

약어:

ON = 올리고뉴클레오타이드

ODN = 올리고데옥시리보뉴클레오타이드

S-ODN = 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드

C-5-P = C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드

II. 안티센스 올리고뉴클레오타이드

A. 서열

본 발명의 안티센스 약제는 표적 RNA 서열과의 혼성화를 위한 뉴클레오타이드 염기를 제공하는 뉴클레오타이드간 골격 결합에 의해 연결된 뉴클레오타이드 서브유닛을 포함한다. 이러한 안티센스 약제의 염기 서열은 p53 mRNA 부분에 상보적(안티센스)이다. SEQ ID NO:1에 상응하는 제 1의 염기서열은 래트 p53 mRNA의 독특한 부분(잔기 1182 내지 1199; Genbank accession # X13058)에 상보적이고 여기에서 p53T로 언급된다. 이 서열은 래트, 마우스, 원숭이, 및 인간 mRNA에서 동일하고, 따라서, 동물 모델에서 생체내 시험에 이상적으로 적합하다.

OL(1)p53으로 명명된 SEQ ID NO:2에 상응하는 제 2의 서열은 인간 p53에 대한 안티센스이고 따라서, 인간에서 p53의 발현을 억제하기에 효과적이다. (Iverson, U.S. Patent No. 5,641,754). 이 서열은 래트 서열과 4개의 미스매치(mismatch)를 가지기 때문에, 래트에서 p53의 발현을 변형시키지 않고 따라서, 래트 모델 연구에서 유용한 대조군이다.

B. 올리고뉴클레오타이드 구조

당업계에서 공지된 다양한 올리고뉴클레오타이드 유사체는 안정성, 특히 뉴클레아제 내성, 비-특이적 결합의 감소, 및 생체이용률(즉, 세포로의 접근)과 같은 영역에서 '천연' 폴리뉴클레오타이드보다 잇점을 제공한다. 이 구조는 골격, 당 부분, 또는 염기 그 자체에서 변형될 수 있다. 이러한 유사체는 예를 들어, 포스포로티오에이트(여기에 S-ODN으로 명명됨), 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드(C-5-P), 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산(PNA's), 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트이다.

이러한 안티센스 약제의 조제물은 당업계에서 잘 알려져있고, 종종 자동화된 합성기에서 용이하게 수행된다. S-ODN, C-5-P, 및 비전하 모르폴리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 합성에 관한 일반적인 절차가 실시예 1에서 보여진다.

2개의 일반적인 기작이 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 발현 억제를 설명하기 위해 제시되었다. (예를 들어, Agrawal; Bonham; Boudvillain; 및 여기에 언급된 참고문헌을 참조) 제 1의 기작은, 올리고뉴클레오타이드 및 mRNA 사이에 형성된 헤테로듀플렉스가 RNaseH에 대한 기질로서 작용하여 mRNA의 절단을 유발한다. 이 종류에 속하는, 또한 속하도록 제안된 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 및 포스포디에스테르(즉, 변형되지 않은 '천연' 올리고뉴클레오타이드)를 포함한다. 이러한 화합물은 일반적으로 높은 활성을 나타내고, 포스포로티오에이트는 통상적으로 안티센스 이용에 가장 넓게 이용되는 올리고뉴클레오타이드이다. 그러나, 이러한 화합물은 세포 단백질과의 비-특이적 결합(Gee)뿐만 아니라 비-표적 RNA 이형체의 부적당한 RNase 절단(Giles)으로 인한 바람직하지 않은 부작용을 일으키는 경향이 있다.

'입체 차단제' 또는, 대안적으로, 'RNase 불활성' 또는 'RNase 내성'으로 언급된 올리고뉴클레오타이드 유사체의 제 2의 종류는 RNase H를 활성화시키는 것이 관찰되지 않고, 표적 RNA 형성, 핵세포질 송달 또는 번역을 입체적으로 차단하여 작용하는 것으로 믿어진다. 이 종류는 메틸포스포네이트(Toulme)뿐만 아니라 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산(PNA's), 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드(Bonham), 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트(Gee)를 포함한다. 그들은 AUG 개시 코돈, 5'-스플라이스(splice) 위치, 또는 mRNA의 5'-비번역 부위에 표적화될 때 가장 효과적인 것으로 보고된다. 지금까지, 암호화 부위의 다운스트림(downstream)에 표적화될 때, 그들은 상대적으로 낮거나(Bonham), 더욱 빈번하게는 어떠한 활성도 보이지 않았다. (예를 들어, 메틸포스포네이트에 대한 Toulme; PNA's에 대한 Gambacorti; 이중가닥 형성 PNA's에 대한 Knudsen; 및 PNS's 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트에 대한 Gee 참조). 암호화 부위로 지시될 때, ON's에 의해 형성된 혼성체는 번역동안 리보솜 복합체의 풀림 작용에 의해 대체되는 것을 피할 수 있을만큼 충분히 안정적이지는 않다는 것이 제안되어왔다. (Boudvillain, Gee) 이 문제를 풀기 위한 하나의 접근으로 ON을 그것의 표적 서열에 공유결합으로 연결 또는 삽입해왔다. (Gee, Johansson). 그러나, 이러한 변형없이는, ON's의 입체 차단 활성은 일반적으로 상기에 언급된 개시 부위에 제한되어왔다.

III. 증식하는 세포에 p53의 유발 및 안티센스 p53에 의한 억제

이전에 발표된 논문에서 (Arora, 1998), 상기에 기술된 안티센스 약제 p53T 및 ON(1)p53은 실시예 2에 기술된 대로, 부분적인 간절제수술후 즉시 래트에 투여되었다. 재생 래트 간은 천연 조직 환경에서 성장 조절 및 세포 증식의 기작을 연구하기에 훌륭한 생체내 모델 시스템이다. 재생 간에서 빠르게 증식하는 세포는 세포주기 사이에 DNA 수복을 위해 최소한의 시간만이 이용가능하므로 가장 암화되기

쉽다.(Grisham,1983). 상기에 언급된 대로, ON(1)p53 은 래트에서 p53 발현을 변형하지 않고, 대조군으로 사용되었다.

PH (post-hepatectomy) 래트내에 재생 과정 동안 p53 의 대량 유발이 관찰되었다. 안티센스 ON 투여에 따른 결과 즉, 재생간의 중량 증가; p53 ,PCNA, p21 및 NADPH 수준; 분리된 세포의 DNA 함량 ; 마이크로솜 단백질 함량; 다양한 마이크로솜 효소 분석법; 지질 과산화에 의한 증거로서 산화 스트레스; 및 유사분열 지표가 측정되었다.

안티센스 p53T(SEQ ID NO:1)으로 처리될 때, 중량 증가(대조군과 상대적임), 유사분열지표 및 세포 증식의 정확한 마커인 PCNA 발현(Assy,1998), 및 G₁ 세포 군의 5-배 감소에 의한 증거대로, 간은 그들의 G₁-S 세포 주기 체크포인트 활성을 잃는다. p53T - 처리된 PH 래트 간은 또한 많은 다핵세포를 나타낸다. 효소 분석법에 의해 결정된대로, 재생 간의 기능적인 수복은 p53 억제에 의해 역시 증가되었다.

요약적으로, 데이터는 p53 발현은 안티센스 p53T (SEQ ID NO:1) 처리된 간절제수술후 래트의 재생 간에서 억제된다는 것과, 이러한 억제는 증가된 유사분열, 증가된 PCNA 발현, 및 세포 주기의 G₁ 기에서 감소된 세포 수를 야기한다는 것을 보여주었다. 결과는 p53 의 G₁-S 세포 주기 체크포인트 활성과 일치한다.

IV. S-ODN, C-5-P, 및 모르폴리노 안티센스 약제의 비교 결과

SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2 로 주어진 염기 서열을 가진 중성-골격 모르폴리노 안티센스 약제를 실시예 1 에 기술된대로 준비했다. 이러한 모르폴리노 올리고머는 RNA 표적에 높은 결합 친화성을 나타냈고, 비전하 골격은 세포내의 흡수에 유리하고 포스포로티오에이트와 같은 전하 유사체와 비교하여 비-특이적 결합 상호작용이 감소한다. 또한 상응하는 C-5-프로핀 시토신 변형된 (C-5-P) 포스포로티오에이트가 준비되었다. 상기에 논의된 대로, 모르폴리노 유사체는 '입체 차단제'로서 작용하는 것으로 여겨진다. 일반적으로 포스포로티오에이트에 속하는 C-5-P 포스포로티오에이트는 RNase-H 의존 기작(Wagner)에 의해 작용하는 것으로 보고된다.

단락 III 및 실시예 2 에 기술된 대로 PH 후 24 시간 경과된 잔류 재생 간의 흡수 중량 증가에 관하여, 안티센스 약제의 복각내 투여의 결과가 비변형 포스포로티오에이트(S-ODNs)의 결과와 비교되었다. 도 2 에서 보여지는 데이터는 p53T 서열이 시험된 대안적인 유사체, 및 시험된 투여량에서 대안적 유사체를 가지고 불활성(기대된 대로임)으로 남아있는 OL(1)p53 서열 모두에 대해 간 재생 모델에서 활성이 있는 것을 보여준다.

S-ODN p53T 의 1mg/200gm 투여량과 유사한 효능이 100µg/200gm 의 C-5-P 변형된 S-ODN 및 50 nM/200 gm (대략 3.7 mg/200g)의 모르폴리노 안티-p53T 올리고뉴클레오타이드(SEQ ID NO:1을 가짐)로 관찰되었다. 모르폴리노 안티센스 올리고머가 5'-비변역 부위 또는 ANG 개시 코돈보다는 유전자의 암호화 부위의 엑손 10 에 표적화될 때 활성이 있다는 것은 특히 가치있다. 상기에 언급된 대로, '입체 차단제' 안티센스 약제는 일반적으로 AUG 번역 개시 시점으로부터 다운스트림에 표적화 될 때 중요한 활성을 나타내지 않았다. 이 암호화 서열은 안티센스 ON 결합에 특히 유리하여 입체적으로 번역을 차단할 만큼 안정한 이중가닥을 형성한다. 게다가, 상기에 언급된 대로, 모르폴리노 올리고머는 RNA-결합 분자에 특히 효과적인 것이 증명되었다. 발명이 특정 기작에 국한되지 않는한, RNA 헬릭스는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 결합에 의해 변형되고, 이 변형은 리보솜의 결합을 방해한다는 것이 예상된다.

본 발명을 뒷받침하기 위한 연구는 C-5-P 프로핀 변형된 ODN 의 프로핀기가 RNA 이중가닥의 메이저 그루브(groove)내로 돌출되어 또한 입체적으로 리보솜 결합을 방해할 수 있다는 것을 제안했다. 따라서, 프로핀기의 t-부틸과 같은 다른 전자 구조를 가지는 기를 포함하는 다른 입체적으로 부피가 큰 기로의 치환은 유사한 억제 효과를 나타낼 수 있다.

V. 치료법

본 발명은 p53 유발을 특징으로 하고, p53 의 억제가 치료적인 잇점을 나타내는 세포에서 특히 p53 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 p53 유발을 특징으로하는 질병 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2 에 상응하는 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드를 이러한 상태를 가지는 대상, 또는 이러한 대상으로부터 수집된 세포로의 투여를 포함한다. 바람직하게는, 대상은 인간 대상이다. (상기에 언급된 대로, SEQ ID NO:2 는 래트 모델에는 효과적이지 않다.) 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, N3'→ P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드, 또는 C-5-프로핀 파리미딘-변형된 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이다. 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 특히 양 서열에 바람직하다. C-5-P 변형된 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드가 또한 기대된다.

본 명세서에서 보여지고 Arora ,1998 에 보고된 데이터에서 증명된대로, 항(anti)-p53 ON 은 간절제술 후의 래트에서 p53 의 발현을 억제한다. 모르폴리노 및 C-5-P ON's 가 재생 간의 중량 증가에 의해 결정된 대로 동량의 비변형 포스포로티오에이트(S-ODN)보다 더욱 효과적임이 밝혀졌다. 모르폴리노 올리고머가 RNase-불활성('입체 차단제') 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 종래의 표적인 AUG 개시 부위에서 상당히 다운스트림인 암호화 부위(엑손10)에 표적화된 점을 고려하면 이외로 효과적이다.

A. 항-증식적인 치료법

상기에 언급된 대로, p53 발현의 유발은 다양한 DNA -손상 약제에 노출된 세포에서 관찰된다. 손상된 DNA 는 대부분 일반적으로 비계획적인 DNA 합성에 의해 수복된다. 이러한 수복은 일반적으로 S (합성)기에 선행하는 세포주기의 G₁ 기동안에 발생한다. 그러나, 만약 변형된 DNA 염기가 수복되지 않고 남아 있다면 (G₁-S 세포 주기 체크포인트의 배제로 미성숙한채로 세포를 S 기로 보냄), 결과는 손상된 DNA 뉴클레오타이드 염기 주형의 잘못된 복제로 인한 돌연변이화, 및 /또는 세포의 손상된 DNA 위치를 지나 그것의 게놈 복제능으로 인한 세포 사멸을 포함할 수 있다.

p53 의 발현 억제는 이 세포 주기 체크포인트를 억제하고 따라서, 선택적으로 DNA-손상된 세포를 죽이는

데 사용될 수 있다. 서열 OL(1)p53(SEQ ID NO:2)을 가진 안티센스 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 투여는 인간 간 세포에서 생체외 및 생체내에서 아포토시스를 생산했다는 것이 U.S. 특허번호 5,641,764 (Iverson)에 개시되었다. 효과는 세포를 증가된 세포내 순 반응성 산소 함유량이 증가된 조건에 노출하는 것에 의해 증강되었다. 정상적인 조직은 암 세포보다 산소 스캐빈저 활성이 더 크기 때문에 이러한 처리는 정상적인 조직에는 효과가 거의 없거나 역효과가 없었다. 예를 들어, 일반적으로 SOD, 카탈라제, 또는 글루타티온 퍼옥시다제와 같은 하나 이상의 효소를 포함하는 대부분의 세포는 빠르게 산소종과 결합하고 과도한 반응성 산소종을 불활성화시킨다. 상기에 기술된 대로, p53의 억제에 의한 G₁-S 체크포인트의 억제는 손상된 DNA의 수복을 방해하여 돌연변이화 및 세포 사멸을 유발하는 것으로 여겨진다.

따라서, 본 발명의 특히 암세포에 유용한 바람직한 방법에서, ON은 세포독성으로 유발된 라디칼 산소를 증가할 수 있는 억제제와 결합하여 투여된다. 올리고뉴클레오타이드 및 억제제는 우선 투여된 어떤 치료 억제제와 실제로 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 그러나, 최상의 결과는 치료적인 혈액 수준이 획득되도록 허용하는 올리고뉴클레오타이드가 미리 충분히 투여될 때 얻어진다.

증가된 라디칼 산소 수준은 예를 들어, 방사선 또는 안트라사이클린 세포독성 항체 (e.g., 독소루비신)와 같은 세포독성으로 유발된 라디칼 산소를 포획할 수 있는 억제제, BCNU, BSO (뷰티오닌 술폭스아민), 과산화수소, 또는 SOD의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제(슈퍼옥사이드 디스무타제), 카탈라제, GSH 합성효소, GSH 환원제, 또는 GSH 퍼옥시다제에 대한 세포 노출로 생산된다.

세포독성으로 유발된 라디칼 산소를 포획할 수 있는 억제제는 예를 들어, 방사선 증강제, 라디칼 산소를 생산하는 화학치료 억제제, 또는 히드록시 라디칼 형성을 야기하는 숙주 세포와 상호작용 할 수 있는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. (예를 들어, 여기에 참고로서 수록된 문헌명 '올리고뉴클레오타이드와 세포 결합에 의해 유발된 돌연변이화의 억제' 1991년 7월 25일 접수된 Iverson, U.S. Ser.No. 07/735,067 참조). 환자의 표적 세포에 대해 하나 이상의 증강제에 의해 증가될 수 있는 치명적인 효과를 가지는 많은 세포독성 억제제가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 방사선(방사선 치료가 내부적으로 전달되거나 또는 외부 수단에 의해 투여됨) 및 세포독성 억제제가 포함된다. 많은 이러한 억제제의 어떤 예는 L-페닐알라닌 니트로겐 머스타드(엘파란)와 같은 니트로겐 머스타드, 다투노루비신 및 독소루비신(doxorubicin)과 같은 안트라사이클린 화학치료제, 및 시스-디아미노디클로로 플라티늄(시스-플라틴)과 같은 백금 화합물이다.

내부적으로 전달된 방사선은 환자에 주입된 치료적으로 유용한 방사성동위원소를 포함한다. 이러한 방사성동위원소는 방사성 핵종 금속 ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁰⁹Pd, ²¹²Bi, ²⁰³Pb, ²¹²Pb, ²¹¹At, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Ag, ¹³¹I를 포함하나, 여기에 한정된 것은 아니다. 이러한 방사성동위원소는 환자에게 투여될 때, 일반적으로 담체 분자(예를 들어, 킬레이트-항체 결합체의 형태)와 결합할 것이다. 내부적으로 전달된 방사선치료약제의 예는 예를 들어, EP 공개 번호. 188,256에 기술된 대로 항체에 결합한 금속 방사성 핵종 킬레이트이다. 외부적 수단에 의해 투여된 방사선은 코발트 치료와 같은 외부 빔(beam) 방사선이다.

증강제의 선택은 치료될 특정 형태의 종양 및 투여될 세포독성 억제제와 같은 요인에 의존한다. 바람직한 것은, 화합물은 암 세포와 같은 생체내의 어떤 표적 위치에 대해 선택적이다. 예를 들어, U.S. 특허 번호, 4,628,047은 독소루비신과 같은 세포독성 억제제에 대한 다양한 형태의 암세포의 강도를 증가시키는 딜티아졸의 사용을 보고한다. 세포독성 억제제와 증강제의 다른 결합뿐만 아니라 이러한 억제제에 의한 치료에 대한 암세포의 서로 다른 형태의 강도에 있어서의 기대된 차이가 *종양학에서의 중요한 진전*에 논의된다. (DeVita *et al.*, editors, J.B. Lippincott Co., Philadelphia (1986), pp.145-157)

바람직한 증강제는 γ-글루타미시스테인 합성효소를 억제하는 합성 아미노산인 BSO(뷰티오닌 술폭스아민, Chemical Dynamics Corporation, South Plainfield, N.J.)이고, 세포에서 글루타티온(GSH)의 눈에 띄는 감소를 유발한다. 따라서, BSO는 세포의 글루타티온 수준의 감소로 향상된 세포독성 효과를 가진 억제제에 대한 증강제로서 작용하는 것으로 생각된다. 세포내에서 글루타티온을 완전히 제거하는 BSO의 S-이성질체가 특히 바람직하다. (U.S. 특허 번호 5,171,885 및 5,245,077 참조)

증강제 및 세포독성제의 추가적인 결합은 바람직한 표적 세포(예를 들어, 특정 암 세포 라인)에 상응하는 배양 세포를 사용한 시험관내 분석법과 같은 방법을 통해 확인될 수 있다. 예를 들어, Russo *et al.*은 BSO가 특정 형태의 세포 라인에서 글루타티온 합성효소 수준을 낮추는데 효과적인지를 결정하기 위한 분석법을 개시한다.

라디칼 산소 생성 종의 상기 논의에서, 세포독성제 및 증강제는 우선적으로 바람직한 대상 세포, 즉, p53 발현을 특징으로하는 암 세포로 방향지워진다. 이러한 암은 방광암, 뇌암, 유방암, 경부암, 결장암, 식도암, 후두암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 위암 및 갑상선암을 포함한다.

다른 바람직한 방법에서, 안티센스 ON의 투여는 세포 주기의 G₂기에서 M(유사분열)기로의 진행을 방해하는데 효과적인 억제제의 투여를 수반한다. 이러한 억제제는 예를 들어, 펜톡시필린(Russell, 1996), 실리마린(Ahmad, 1998), 스타우로스포린 (Swe, 1997), 페닐아히스틴 (Kano, 1997), 파크릴락셀 (Shu, 1997), 레티노산 (Zhu, 1997), 플라보피리돌(Sedlacek, 1996), 메틸-2,5-디히드로신나메이트(Koch, 1996), 헤르복시딘(Horiguchi, 1996), 9-니트로캅토테신(Khooustov, 1995), 마이토톡신(VanDolah, 1996), 아피게닌(Sato, 1994), 노코다졸, 및 콜세미드(Zhang, 1998)를 포함한다. 최근의 보고(Cross, 1995)는 p53은 세포주기의 유사분열(M)기 동안에 방추 장치의 조립을 완성하도록 보장하는 방추 체크포인트의 도구라는 것을 제안했다. 본 발명을 뒷받침하기 위한 연구에서, p21-결핍 마우스를 상기에 목록화된 것과 같은 G₂-M 억제제로 처리할 때 감염된 세포에서 높은 정도의 이수배 수체를 보였다. 억제제는 세포가 유사분열기를 통해 정상적인 진행을 하는 것과 유사분열(및 G₁-S기) 체크포인트의 결핍을 방지하고, 연속적인 합성(S)기를 수행한 세포가 결과적으로 이수배 수체를 생산하는 것으로 가정된다. p53은 p21의 전사 활성화에 필요하기 때문에, p53이 본 발명의 안티센스 억제제에 의

해 억제된 세포가 유사한 결과를 보인다.

노코다졸 또는 콤세이드(Cross,Zhang) 방추 억제제는 또한 항 p53 안티센스 억제제와 결합하여 사용될 수 있다. p53-의존적인 방추 체크포인트의 부재에서, 이러한 세포는 비정상적인 또는 불완전한 유사분열 기를 가진 연속적인 세포 주기를 수행할 것으로 기대되고, 또한 다배수체 또는 이수배수체를 유발한다.

다른 과증식성 장애가 또한 치료될 수 있다. 과증식성 피부 장애의 예는 일반적으로 사마귀와 결합된 인간 파필로마 바이러스(HPV)-감염된 세포, 흑색종과 같은 피부의 피상적 종양, 전-악성 및 악성 암종, 자외선 각막염, 흉반성 루푸스, 피부염, 및 건선이다. 다른 상피조직(예를 들어, 내피, 종피)의 과증식성 질병은 천식 및 기관지염과 같은 가역적인 폐쇄성 기도 질병을 포함한다. 원뿔 각막, 각결막염, 준결막염, 및 각막염 백반을 포함하는 눈의 다양한 과증식성 장애가 또한 치료될 수 있다. 이 방법은 초기의 평활근 세포 증식, 혈관 폐색, 및 레스테노시스와 같은 과증식성 혈관질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

B. 저산소증 또는 국소빈혈 상태의 치료

p53 유발을 특징으로하는 다른 질병 상태는 뇌졸중과 같은 국소 빈혈 공격의 결과와 같은 저산소증 상태를 포함한다. 예를 들어, p53 은 대뇌(Li), 및 국소빈혈 및 간질(Xiang) 모델의 손상된 뉴론에서의 국소빈혈 후의 아포토시스 세포에서 우선적으로 발현되는 것이 관찰되었다. Raafat 는 신장의 국소빈혈/재살포후에 증가된 수준의 p53 을 관찰했고, 그 증가가 아포토시스를 촉진할 수 있다는 것을 제안했다. 열쇼크는 또한 p53 을 유발하는 것으로 보고되었다.(Graeber) 그러므로, 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 항-p53 안티센스 억제제에 의한 열쇼크, 간질성 경련, 뇌졸중, 및 국소빈혈 및/또는 재살포의 다른 발생(e.g. 기관 이식에 따름)과 같은 스트레스에 놓은 조직의 치료를 포함한다.

VI. 조제물 및 투여

A. 치료적 조제물

본 발명의 치료 방법에 따른 투여를 위해서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 적당한 액체 부형제 또는 부형제, 및 선택적인 보조 첨가제와 같은 제약학적으로 허용가능한 담체와 결합한다. 액체 부형제 및 부형제는 종래의 상업상 이용가능한 것이다. 이의 예로는 증류수, 생리적 식염수, 덱스트로스의 수용액, 그 밖의 것들이다.

일반적으로, 활성 화합물에 추가하여, 본 발명의 제약학적 조제물은 활성 화합물을 제약학적으로 이용가능한 조제물로 가공처리를 용이하게하는 적당한 부형제 및 보조제를 포함할 수 있다. 특히, 적당한 부형제는 예를 들어, 락토우스 또는 수크로스, 만니톨 또는 솔비톨, 셀룰로스 조제물인 당과 같은 첨가제 및/또는 칼슘 포스페이트, 및 전분, 젤라틴, 검 트라가칸트(gum tragacanth), 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 소동 카르복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐 피롤리돈과 같은 결합제이다. 바람직하다면, 상기 언급된 전분뿐만 아니라 카르복시메틸 전분, 교차결합된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 알긴산, 또는 이들의 염과 같은 붕괴제가 첨가될 수 있다. 보조제는 예를 들어, 실리카, 활석, 스테아르산 또는 이들의 염, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 유량-조절제 및 윤활제를 포함한다.

당제 코어는 바람직하다면, 위액에 내성이 있는 적당한 피복으로 제공될 수 있다. 이러한 목적을 위해서, 선택적으로 아라비아 고무, 활석, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 및/또는 이산화 티탄, 래커 용액, 및 적당한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 포함할 수 있는 농축된 당 용액이 사용될 수 있다. 위액에 내성이 있는 피복을 생산하기 위해서 아세틸셀룰로스 프탈레이트 또는 히드록시프로필메틸-셀룰로스 프탈레이트와 같은 적당한 셀룰로스 조제물 용액이 사용된다. 색소 및 염료가 동정 또는 서로 다른 조합의 활성 화합물 투여량을 특징화하기 위해서 당제의 정제에 첨가될 수 있다.

구강용으로 사용될 수 있는 다른 제약학적 조제물은 젤라틴으로 만들어진 눌러 끼워맞춘(push-fit) 캡슐뿐만 아니라 젤라틴으로 만들어진 부드러운, 밀봉 캡슐 및 글리세롤 또는 솔비톨과 같은 가소제를 포함한다. 눌러 끼워맞춘 캡슐은 락토스와 같은 첨가제, 전분과 같은 결합제, 및/또는 활석 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제 및 선택적으로 안정제와 혼합될 수 있는 과립형태로 활성 화합물을 포함할 수 있다. 부드러운 캡슐에서, 활성 화합물은 바람직하게는 지방유, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 액체에 용해되거나 현탁된다. 게다가, 안정제가 첨가될 수 있다.

직장으로 사용될 수 있는 제약학적 조제물은 예를 들어, 활성 화합물과 좌약 염기의 결합으로 구성된 좌약을 포함할 수 있다. 적당한 좌약 염기는 천연 또는 합성 트리글리세라이드, 파라핀 탄화수소, 폴리에틸렌글리콜, 또는 고급의 알칸올을 포함한다. 게다가, 염기와 활성 화합물의 결합으로 구성된 젤라틴 직장 투여 캡슐을 사용하는 것이 가능하다. 가능한 염기 물질은 액체 트리글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 파라핀 탄화수소를 포함한다.

비경구적 투여를 위한 적당한 액체 조성물은 수용성 또는 물-분산가능한 형태에서 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 게다가, 활성 화합물의 현탁액이 적당한 오일 주입 현탁액으로 투여될 수 있다. 적당한 친유성 용매 또는 부형제는 예를 들어, 참깨유와 같은 지방유 또는 예를 들어, 에틸 올레인산염 또는 트리글리세라이드와 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주입 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 소동 카르복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 및/또는 덱스트란과 같은 물질을 함유할 수 있다. 현탁액은 또한 안정제를 함유할 수 있다.

종래의 당체에 의한 투여에 추가적으로, 활성 성분은 다양한 특화된 송달 기법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 리포솜에 봉입되어 투여될 수 있다. 용해도에 의존적인 활성 성분은 수성 페이즈 및 지질층(들) 모두, 또는 일반적으로 리포솜 현탁액으로 명명된 것에 존재할 수 있다. 지질층은 일반적으로 렉틴 또는 스피고마이린과 같은 인지질, 콜레스테롤과 같은 스테로이드, 디아세틸포스페이트와 같은 이온성 계면활성제, 스테아릴아민, 또는 인지질산, 및/또는 다른 소수성 물질을 포함한다. 리포솜의 직경은 일반적으로 약 15 nm 내지 약 5 μ 의 범위이다.

이러한 당제 형태를 준비하는 방법은 공지되거나 또는 당업계에서 숙련자에게 자명할 것이다. 예를 들어,

레밍톤의 제약학(Remington's Pharmaceutical Science) (19 th., Ed., William & Wilkins, 1995) 참조. 제약학적 조제물은 당업계에 잘 알려진 공정을 따라 제조된다. 예를 들어, 종래의 혼합, 과립형성, 당제-제조, 용해, 또는 동결건조과정에 의해 만들 수 있다. 사용되는 과정은 궁극적으로 사용되는 활성 성분의 물리적인 특성에 의존할 것이다.

B. 종양의 치료

조제물은 대상에 구강으로 투여되거나, 예를 들어, 정맥내주사, 피하주사, 복강내주사, 또는 근육내주사에 의해 경피적으로 또는 비구강적으로 투여될 수 있다. 생체내에서 항종양제 사용을 위해서, p53 mRNA 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 정맥내로 투여된다.

본 발명에 따라서, p53 의 발현을 억제하여 산화 수복 경로 하향조절자로 작용하는 올리고뉴클레오타이드는 세포독성에 의해 유발된 라디칼 산소를 포획할 수 있는 약제의 투여 이전에 또는 이와 공동으로 환자에 투여된다. 동시에 투여될 때, 두 활성 약제는 결합된 형태 또는 비결합 형태일 수 있다. 결합된 형태라면, 결합체는 쪼개질 수 있는 결합을 포함하여 표적위치에서 올리고뉴클레오타이드 및 세포독성 약제가 해리되도록 하는 것이 바람직하다.

투여될 각각의 약제량은 제약학적으로 유효한 두가지 형태의 약제의 결합이다. 투여량은 나이, 건강, 성별, 환자의 키 및 몸무게, 투여 경로, 약의 독성, 및 올리고뉴클레오타이드 및 세포 독성 약제에 대한 약의 상대적인 감도와 같은 요인에 따라 다양할 것이다. 대부분의 세포 독성 약제에 대한 추천되는 투여량 및 투여형태가 확립되었고 Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J. 에 의해서 출판된 의사의 탁상용 참고(Physicians Desk Reference)와 같은 종래의 자료로부터 얻을 수 있다. 필요하다면, 이러한 지표는 예를 들어, 임상학적 시도와 같은 잘 확립된 절차 및 분석에 의해 각 시스템에 대해 결정될 수 있다.

생체내 사용을 위해서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 바람직한 투여량은 약 0.01 내지 1 μ 몰/1 의 혈액 내 농도에 도달하기에 필요한 전형적인 양이다. 이 농도는 다양한 방법으로 획득될 수 있다; 연속적인 IV 주입에 의한 약 0.05 내지 약 0.2mg/kg/시간 범위내의 투여량이 허용가능한 것으로 밝혀졌다. 더 많거나 적은양의 올리고뉴클레오타이드가 필요량으로 투여될 수 있다.

하기의 실시예 3 은 인간 B-세포 림프종의 치료에서의 본 발명의 이용을 증명한다.

C. 국소빈혈 상해의 치료

국소빈혈 상태는 심부전증에 의해 야기되는 것과 같은 뇌순환의 단속 또는 뇌의 혈액 공급의 전면적인 손실을 야기하는 다른 상태, 또는 뇌출혈로 인한 것과 같은 혈액 출혈에서의 국부적인 단속, 또는 국부적인 혈전성 또는 색전성 이벤트, 또는 머리 외상때만일 수 있다. 치료되는 국소빈혈 상태는 일반적으로 뇌의 혈관의 폐색 또는 파열에 의해 야기되는 신경계 기능의 갑작스러운 감소 또는 손실로 정의되는 뇌졸중과 연결된다. 본래의 국소빈혈 사건의 결과로서 2차적인 뇌 손상은 전형적으로 국소빈혈 상해를 둘러싼 부위, 국한성 국소빈혈의 경우, 및 또는 해마 또는 대뇌기저핵과 같은 병소의 선택적 취약한 부위, 전(global) 국소빈혈에서의 뇌 세포 파괴, 또는 병소를 포함한다. 2차적인 손상은 종종 단-기간 또는 장-기간 기억상실과 같은 기능적 장애에 의해 발현될 수 있다.

ON 은 비구강적 투여를 위해 무균의 생리적인 식염수 용액과 같은 적당한 불활성 담체로 조제된다. 투여되는 투여량은 투여경로에 따라 결정될 것이다. 하나의 적당한 경로는 약 50 μ g-5mg ON/kg 체중의 투여량 수준에서 인트라셀레브로벤티큐라(intracerebroventricular)(ICV)이다. 제약학적 유효 투여량 즉, 해부학적 및/또는 기능적 손상에서 상당한 감소를 나타내기에 효과적인 투여량은 국소빈혈 및 뇌졸중 손상에 대한 모델 시스템에서 보여지는 투여량/반응으로부터 측정될 수 있다. 이러한 모델 시스템은 게르빌 루쉬 쥐 모델의 목의 경동맥의 순간적인 폐색에 의해 생산되는 전 국소빈혈 및 래트 4- 혈관 폐색 모델을 포함한다. 조직은 해부학적 손상을 위해 조사되고, 기능적인 손상은 동물에서 대뇌 국소빈혈의 일반적인 결과인 활동항진 또는 단기간 기억력에 대한 영향을 관찰하여 평가될 수 있다. 이러한 과정은 당업계에 공지된다; 예를 들어, U.S. 특허 번호, 5,051,403 참조.

D. 레스테노시스 (Restenosis)

특히 안티센스 약제와 관련된 성공적인 항-레스테노시스의 치료법의 중요한 측면은 안티센스 올리고머를 감염된 세포에 효과적으로 운반하는 것이다. 체계적으로 투여된 항-레스테노시스 약제는 허용가능하지 않은 높은 농도의 약제를 사용하지 않으면, 혈관 상해 위치에 효과적인 농도를 얻는 것에 전형적으로 실패한다. 발명의 명칭 ' CMV 의 안티센스 표적화에 의한 레스테노시스 치료 방법', 공유되고 공유출원 계류중인 U.S. 출원 일련 번호 09/062,160 에 개시된 것과 같은 송달 장치는 올리고머를 환자의 혈관확장술의 위치에 송달하는데 사용될 수 있다. 올리고머는 바람직하게는 모르폴리노 올리고머이고, 바람직하게는 제약학적으로 허용가능한 담체안에 함유된다. 올리고머는 또한 상기 참고 출원에 또한 개시된 생물학적양립가능한 중합체 담체에 함유될 수 있다.

바람직하게는, 올리고머는 혈관확장술 절차와 동시에 송달된다. Farrell 에 보고된 것과 같이 화합물이 풍선-상해 동맥(ballon-injured arteries)에 투여될 때, 세포에 의한 올리고뉴클레오타이드의 흡수는 정상 동맥에 의한 흡수와 비교하여 눈에 띄게 증가할 수 있다. 본 발명의 조제물을 사용한 약제 치료법은 방사선 또는 광역학 치료법과 결합될 수 있다.

투여량은 대상의 크기, 투여 경로, 및 표준 제약학적 경험에 따른 감염된 조직의 범위에 따라 결정된다. 약제의 바람직한 수준은 허용될 수 없는 부작용없이, p53 발현을 억제하고, 레스테노시스를 감소하거나 방지하는데 효과적인 수준이다. 성인의 경우에, 추천된 투여량은 1내지 25 μ 몰의 범위의 안티센스 올리고머이고, 바람직하게는 2내지 15 μ 몰이다. 투여 경로에 대한 최적의 투여량은 당업계에 공지된 방법에 따른 동상의 실험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 혈관 상해 위치에서의 투여의 경우에, Edelman 및 Rosenberg 에 기술된 것과 같은 생체내 모델이 사용가능하다.

올리고머가 약 송달 장치에 결합될 때, 상기에 기술된 대로, 장치는 적당한 투여량의 약제를 송달하기에

효과적이다. 치료될 조직의 표면적에 관하여, 효과적인 투여량은 전형적으로 혈관벽의 cm^2 당 30 내지 3000 μg 의 범위이고, 더욱 바람직하게는 약 300 내지 1500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이다. 환자는 또한 혈관확장술 후에 추가적 기초하에 레스테노시스를 더 억제하기에 충분한 투여량 수준에서 조성물을 투여받을 수 있다.

본 발명이 특정한 방법 및 구체예에 관하여 기술되었던 반면에, 다양한 변형이 본 발명의 취지에서 벗어 나지 않고 만들어질 수 있다.

실시예

실시예 1

올리고뉴클레오타이드 합성

모든 사슬-연장 합성을 1 μ 몰 컬럼 지지를 사용한 응용 바이오시스템 모델(Applied Biosystems Model) 380B DNA 합성기(Foster City, CA) 및 ABI User Bulletin, 번호. 58.1991 에 개시된 바와 같은 포스포르 아미데이트 화학을 사용한 시아노에틸 접급상에서 수행했다. 합성기를 사용자 매뉴얼의 프로토콜로 프로 그램했다.

전형적인 합성 개요는; 3' 히드록시기에 의해 연결된 ODN 의 3' 염기(즉, 비변형 뉴클레오타이드, C-5-프 로핀 뉴클레오타이드, 또는 모르폴리노 뉴클레오타이드 유사체)를 1 μ 몰 실리카 겔 지지체 컬럼에 삽입하 고, 합성을 3' 에서 5' 방향으로 염기형태에 따라 하나씩 수행한다. 모든 액체 시약은 Applied Biosystems, Inc 에 의해 공급된다. 아르곤 개스가 Air Products(Omaha)에 의해 공급된다. 첫번째 단계 는, 아세톤니트릴, 그 다음 컬럼내의 어떤 잔여물을 제거하는 아르곤 개스로 컬럼을 플러싱(flushing) 한다. 다음에, 트리콜로아세틱산은 ODN 합성동안 뉴클레오타이드의 5' 산소에 캡을 형성하는 디메톡시트리 탈(DMT)기를 양자화한다. 다음에, 양자화된 DMT는 염기로부터 제거된다. 컬럼을 아세톤니트릴 및 아르곤 으로 다시 플러시한다. DMT 잔여물을 DMT 잔여물 포트에 수거하고 시험 튜브로 옮겨서 밝은 오렌지 색상 인지를 체크했다. 색상 체크를 디트리탈화가 성공적인지를 확인하기 위해 수행한다. DMT 기는 498 nm 에 서 해당 흡광도로 분광광도적으로 정량화될 수 있다. 색상이 밝은 오렌지가 아니라면, 다음에 염기의 디 트리탈화는 성공적으로 수행될 수 없을 것이고 불순한 ODNs 의 합성이 일어날 수 있다. 합성의 다음 단 계는 ODN 서열의 다음 염기의 결합이다. 시아노에틸 포스포르아미데이트로 변형된 적당한 뉴클레오타이드 염기는 아세톤니트릴에서 용해되고 테트라졸로 컬럼에 운반된다. 염기는 반응하여 뉴클레오타이드간 포스 파이트 결합을 형성한다. 컬럼을 아세톤니트릴 및 아르곤으로 플러시한다. 컬럼을 아세트산 무수물 및 1-메틸이미디졸로 플러시하여 어떤 비결합의 5' 히드록시기를 아세탈기로 캡핑한다. 캡은 비결합 염기를 합성동안에 결합에 의한 어떤 연속으로부터 방지하고 불순물의 길이를 감소시킬것이다. 컬럼을 다시 플 러시하고 3 가 포스파이트를 테트라에틸티우방 디설파이드 및 아세톤니트릴에 의해 5 가 포스포로티오에 이트 트리에스테르로 산화한다. 컬럼을 아세톤니트릴 및 아르곤으로 플러시한다. 다음에, 디트리탈화 단계 에서 시작하여 서열내의 다음 염기에 대한 합성을 다시 반복한다. 컬럼에 알루미늄 히드록사이드를 통과 시키고 용출액을 수거하여 S-ODNs 를 컬럼으로부터 절단한다. 알루미늄 히드록사이드 및 시아노에틸(포 스파이트 결합으로부터)을 하룻밤동안 진공 원심분리기로 S-ODN 용액의 증류에 의해 제거한다. 건조된 ODN 를 무균 식염수로 희석한다. S-ODN 의 순도를 10% 폴리아크릴아마이드 겔상에 물로 희석된 S-ODN 의 샘플을 처리하여 체크한다. S-ODN 의 농도를 260 nm 흡광도에서 해당하고 소광율로 흡광도를 증가시 키는 것에 의해 결정한다.

모르폴리노 올리고뉴클레오타이드의 제조에 있어 더욱 자세한 사항은 예를 들어, Summerton and Weller, *안티센스 및 핵산 약제 발전*, 7: 187-195(1997)에서 밝혀질 수 있다.

실시예 2

부분적인 간절제술

부분적인 간절제술 연구를 무게 200 내지 220 그램의 수컷 Sprague Dawley 래트(Sasco, Omaha NE)에서 수 행했다. 동물을 UNMC's AAALAC-승인된 시설에서 깨끗한 플라스틱 케이지에서 12 시간씩 낮/밤 주기로 사 육했고, Purina 래트 식사 및 무제한적인 담수예의 접근을 허용했다. 동물 프로토콜을 대학의 제도적인 동물 보호 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)로부터 승인받았다.

절차를 Higgins 및 Anderson 에 개시된대로 수행했다.(1931) 무균의 외과 수술 기법을 사용했다. 래트 를 메톡시플루란(Mallinckrodt Veterinary, Mundelin, IL)을 사용하여 마취했고 래트의 복부면이 노출되 도록 위치시켰다. 3 내지 4 cm 길이 부위를 경상돌기 바로 후측의 정중앙 선을 따라 면도했고 베타다인 으로 면봉했다. 정중앙선을 따라 절개하여 간을 노출시켰다. 중앙 및 왼쪽 측면의 엽(lobe)을 안전하게 연결하고 다음에 절개했다. 이것은 총 간의 대략 65 내지 70% 의 제거를 초래했다. 복강 절개를 두 층으 로 폐쇄했다. 부분적인 간절제술을 받지않은 대조군 래트를 동일하나 그들의 간을 단지 노출시키고 부 분적으로 절개하지 않는 허위 외과수술을 수행했다.

올리고뉴클레오타이드 투여

ODNs 를 1 mg/200gm/ 일 S-ODN , 0.1mg/220g/ 일 C-5-P S-ODN, 및 50 nM (대략. 3.4 mg)200g/일 모르폴 리노의 투여량으로 복강내로 주사했다. 모든 래트에 실험의 길이에 따라, 외과수술후 의식을 얻은 직 후, 및 매 24 시간 후에 각각의 ODNs를 투여했다. 다음에, 래트를 외과수술후 1, 2, 5 또는 7 일 동안 수 복을 허용했다. 숨은 체중증가를 도 1 에서 보여지는 데이터를 나타내는 ODN 의 투여 후 24 시간안에 결정했다.

실시예 3

인간 B-세포 림프종의 치료

약물 치료 섭생법: 0 일에서 시작하여, 환자는 정맥 접근 장치를 통해 7일동안 연속적인 IV 주입으로서 0.2 mg/kg/hr 의 투여량으로 SEQ ID NO:1 을 가지는 모르폴리노 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 투여받

는다. MINE 화학치료법을 4 일에서 시작하여 하기의 스케줄에 따라 수행한다.

- Mesna Injection(MESNEX™, Bristol-Meyers Oncology) : Ifosfamide 전에 30 분 동안 500mg/M² IV, Ifosfamide 후에 4 시간 동안 250mg/M² IV, 4 일부터 7일 까지 매일 Ifosfamide 후에 8 시간 동안 구강으로 250mg/M².

- Ifosfamide (IFEX™, Bristol-Meyers Oncology) : 4-7일동안 매일 1.33 g/M² IV.

- Mitoxantrone hydrochloride(NOVANTRONE™, Lederle Laboratories) : 4 일째만 10 mg/M² IV.

- Etoposide(VEPESID™, Bristol-meyers Oncology) : 4-7 일동안 매일 80 mg/M² IV.

환자를 그들의 질병의 독성 및 반응에 대하여 규칙적인 평가를 한다. 환자는 매주 CBC(complete blood count) 및 혈소판 계수를 받는다. 순환을 최대 6 번동안 4 주마다 한번씩 반복한다. 환자를 건강진단에 의해 측정가능한 질병에 대하여 매 순환마다의 반응에 관해 평가한다. 환자를 반응(완전한 반응, 부분적인 반응, 안정한 반응, 또는 진행성 질병)에 따라 분류한다.

환자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 SEQ ID NO:1 (OL(1)p53)의 사용을 포함하지 않는 전통적인 MINE 치료법과 상반되는 본 발명의 치료법으로 향상된 임상적 반응을 보일것으로 기대된다. OL(1)p53 은 세포주기 수복 기작 억제에 의하여 암세포를 MINE 의 효과에 증강시켜서 p53-비독립적인 아포토시스에 의해 암세포를 우선적으로 죽일것으로 기대된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

적당한 제약학적 담체중의 5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 로 확인되는 염기 서열 SEQ ID NO:1, 또는 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 염기서열 SEQ ID NO:2 를 가지는 안티센스 약제의 제약학적 유효량을 대상에 투여하는 것을 포함하는 포유 동물 대상에 p53 의 유발을 특징으로하는 질병 상태를 치료하는 방법으로서, 안티센스 약제는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, N3'-P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드, 또는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드인 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 안티센스 약제는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 안티센스 약제는 서열 SEQ ID NO:1 을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 안티센스 약제는 서열 SEQ ID NO:2 을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 대상은 인간 대상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 질병 상태는 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 세포 수준에서 라디칼 산소 종을 증가시키기에 효과적인 약제로 상기 대상의 치료를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 약제는 방사선 증감제, 이온화 방사선, 고압 산소 환경, 및 세포 수준에서 라디칼 산소 종을 증가시키는 화학요법제로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 화학요법제는 안트라사이클린 또는 안트라퀴논인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 세포 주기의 G₂ 기로부터 M 기로의 진행 방해에 효과적인 약제에 의한 상기 대상의 치료를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 약제는 포스포키나제 C (PKC) 저해제, 비스(클로로에틸)니트로소우레아(BCNU), 펜톡시필린, 실리마린, 스타우로스포린, 페닐아히스틴, 파클리탁셀, 레티노산, 플라보피리돌, 메틸-2,5-디히드로신나메이트, 헤르복시디엔, 9-니트로캄프토테신, 마이토특신, 아피게닌, 노코다졸, 및 콜세미드로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 질병 상태는 국소 빈혈 또는 국소빈혈/재살포 상해로부터 유발되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 으로 확인되는 SEQ ID NO:1, 및 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:2 로 구성되는 군으로부터 선택된 염기 서열을 가지는 안티센스 약제, 및 적당한 제약학적 담체를 포함하며, 안티센스 약제는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드, 또는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 대상에 p53 유발을 특징으로하는 질병 상태 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 안티센스 약제는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제 15 항에 있어서, 안티센스 약제는 서열 SEQ ID NO:1 을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제 15 항에 있어서, 안티센스 약제는 서열 SEQ ID NO:2 를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 으로 확인되는 SEQ ID NO:1, 및 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:2 로 구성되는 군으로부터 선택된 염기 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드로서, 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 2'-O-알릴 또는 2'-O-알킬 변형된 올리고뉴클레오타이드, 및 N3'→ P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 염기 서열 SEQ ID NO:1 을 가지는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 염기 서열 SEQ ID NO:2 를 가지는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드.

청구항 26

제 23 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 포스포로디아미데이트 골격 결합에 의해 연결된 모르폴리노 서브유닛을 포함하는 것

을 특징으로 하는 모르폴리노 올리고뉴클레오티드.

청구항 28

5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:1, 및 5'-CCC TGC TCC CCC CTG GCT CC-3' 로 확인되는 SEQ ID NO:2 로 구성되는 군으로부터 선택된 염기 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드로서, C-5-프로핀 피리미딘-변형된 올리고뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 염기서열 SEQ ID NO:1 을 가지는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 30

제 28 항에 있어서, 염기서열 SEQ ID NO:2 를 가지는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

요약

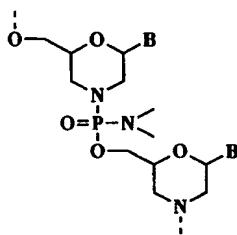
증식성 세포 장애, 예를 들어, 암, 또는 뇌졸중과 같은 국소빈혈 공격으로 유발된 저산소증 상태와 같은 p53 유발을 특징으로하는 질병 상태를 치료하기에 유용한 안티센스 올리고뉴클레오티드가 개시된다. 안티센스 약제는 바람직하게는 모르폴리노 올리고뉴클레오티드, 펩티드 핵산, 2' 0-알릴 또는 2'-0-알릴 변형된 올리고뉴클레오티드, 또는 N3'- P5' 포스포르아미데이트 올리고뉴클레오티드를 포함하는 '입체 차단제' 형 올리고뉴클레오티드로 알려진 종류이다.

색인어

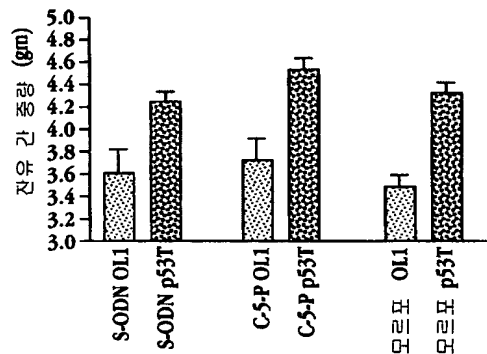
p53, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안티센스 약제

도면

도면1



도면2



서열목록

<110>	AVI BIOPHARMA, INC.<120>	p53 ANTISENSE AGENT AND METHOD<130>	2<150>
US60/105,695<151>	1998-10-26<160>	2<170>	KopatentIn 1.71<210> 1<211> 18<212>
DNA<213>	Artificial Sequence<220><223>	antisense oligonucleotide<400>	1tcagtctgag
tcaggccc			18<210> 2<211> 20<212>
DNA<213>	Artificial Sequence<220><223>	antisense oligonucleotide<400>	2ccctgctccc
ccctgctcc			20